

**Für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodierende Nukleotidsequenzen, Verfahren zu deren Isolierung und ihre Verwendung**

Gegenstand der Erfindung sind für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodierende Nukleotidsequenzen, Verfahren zu deren Auffinden und Isolieren und Verfahren zur fermentativen Herstellung von verzweigtkettigen Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen Gene, die für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodieren, verstärkt werden.

**Stand der Technik**

Die verzweigtkettigen Aminosäuren L-Isoleucin, L-Valin, und L-Leucin finden in der pharmazeutischen Industrie, der Humanmedizin, und in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß verzweigtkettige Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum* hergestellt werden können. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Isoleucin-Analogon Isoleucinhydroxamat (Kisumi M, Ko-

- matsubara S, Sugiura, M, Chibata I (1972) Journal of Bacteriology 110: 761-763), das Valin-Analogon 2-Thiazolealanine (Tsuchida T, Yoshinaga F, Kubota K, Momose H (1975) Agricultural and Biological Chemistry, Japan 39: 1319-1322),  
5 oder das Leucin-Analogon  $\alpha$ -Aminobutyrate (Ambe-Ono Y, Sato K, Totsuka K, Yoshihara Y, Nakamori S (1996) Bioscience Biotechnology Biochemistry 60: 1386-1387) sind, oder die auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und verzweigtkettige Aminosäuren produzieren (Tsuchida T, Yoshinaga F, Kubota K, Momose H, Okumura S (1975) Agricultural and Biological Chemistry; Nakayama K, Kitada S, Kinoshita S  
10 (1961) Journal of General and Applied Microbiology, Japan 7: 52-69; Nakayama K, Kitada S, Sato Z, Kinoshita (1961) Journal General and Applied Microbiology, Japan 7: 41-51).
- 15 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung verzweigtkettige Aminosäuren produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne verzweigtkettige Aminosäuren-Biosynthesegene amplifiziert, und die Auswirkung auf die  
20 verzweigtkettige Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44  
25 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103 (1995)), Sahm et al. (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)), und Eggeling et al., Journal of Biotechnology 56: 168-180 (1997)).

## Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von verzweigt-kettigen Aminosäuren bereitzustellen.

### 5 Beschreibung der Erfindung

Verzweigt-kettige Aminosäuren finden in der pharmazeutischen Industrie, in der Humanmedizin, und in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran  
10 neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von verzweigt-kettigen Aminosäuren bereitzustellen.

Wenn im folgenden verzweigt-kettige Aminosäuren erwähnt werden sind damit insbesondere L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin gemeint.

Gegenstand der Erfindung sind isolierte Polynukleotide,  
15 enthaltend mindestens eine der Polynukleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das mindesten eine Aminosäuresequenz SEQ ID No. 3 oder  
20 5 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit einer Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5,
- 25 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c).

5 Gegenstand der Erfindung ist ebenso eine in coryneformen Mikroorganismen replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest die Nukleotidsequenzen enthält, die für die Gene *brnF* und/oder *brnE*, dargestellt in der SEQ ID No. 1 und in der SEQ ID No. 6, kodieren.

10 Gegenstand ist ebenfalls eine replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No. 1 oder SEQ-ID-No. 6, die für die Gene *brnE* und/oder *brnF* codieren, oder
- 15 (ii) mindestens eine Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i), oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- 20 (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

Polynukleotide gemäß Anspruch 2, enthalten mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den SEQ ID No. 1, 2, 4 oder 6, dargestellten

25

Polypeptide gemäß Anspruch 2, die für Polypeptide codieren, die mindestens eine der Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID No. 3 oder 5 dargestellt, enthalten

ein Vektor, enthaltend das oder die Polynukleotide gemäß Anspruch 1, oder die in SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 6 dargestellte DNA-Sequenz.

5 und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die die vollständigen Gene mit  
10 den Polynukleotidsequenzen entsprechend SEQ ID No. 1, 2, 4 oder 6 enthalten, mit einer Sonde, die die Sequenzen der genannten Polynukleotide gemäß SEQ ID No 1, 2, 4 oder 6 oder ein Fragment davon enthalten und Isolierung der genannten DNA-Sequenzen.

15 Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet, als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Isoleucin-, Leucin- oder Valin-Exportproteine codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit  
20 der des brnF- und/oder brnE-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für Isoleucin-, Leucin- oder Valin-Exportproteine co-  
25 dieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge  
30 von mindestens 40 oder 50 Basenpaaren.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um  
5 nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

10 Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen die Polypeptide gemäß SEQ ID No. 3 und/oder 5, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Transports verzweigtkettiger Aminosäuren und auch solche ein, die zu wenigstens 70 %  
15 identisch sind mit den Polypeptiden gemäß SEQ ID No. 3 und/oder 5, bevorzugt zu wenigstens 80 % und besonders zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit den Polypeptiden gemäß SEQ ID No. 3 und/oder 5 und die genannte Aktivität aufweisen.

Ebenso sind coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der  
20 Gattung Corynebacterium, transformiert durch die Einführung der genannten replizierbaren DNA Gegenstand der Erfindung.

Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von verzweigtkettigen Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere be-  
25 reits die verzweigtkettigen Aminosäuren produzieren und in denen die Nukleotidsequenzen der für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodierenden Gene brnE und/oder brnF verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang  
30 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch

die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können verzweigtkettige Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen.

Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind beispielsweise die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte verzweigtkettige Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme,

wie beispielsweise die Isoleucin produzierenden Stämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 14309  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 14310  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 14311  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 15168  
*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6871,

wie beispielsweise die Leucin produzierenden Stämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 21885

*Brevibacterium flavum* ATCC 21889

oder wie beispielsweise die Valin produzierenden Stämme

5 *Corynebacterium glutamicum* DSM 12455

*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 9325

*Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 9324

*Brevibacterium lactofermentum* FERM-BP 1763.

Den Erfindern gelang es die neuen Gene *brnE* und *brnF* von  
10 *Corynebacterium glutamicum* zu isolieren. Zur Isolierung der  
Gene wird zunächst eine im *brnF*- oder *brnE*-Gen defekte  
Mutante von *C. glutamicum* hergestellt. Hierzu wird ein ge-  
eigneter Ausgangsstamm wie z. B. ATCC14752 oder ATCC13032  
einem Mutagenese-Verfahren unterworfen.

15 Klassische Mutagenese-Verfahren sind die Behandlung mit  
Chemikalien wie z. B. N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin  
oder UV-Bestrahlung. Derartige Verfahren zur Mutationsaus-  
lösung sind allgemein bekannt und können unter anderem bei  
Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory  
20 Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacte-  
ria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im  
Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der  
American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,  
1981) nachgelesen werden.

25 Ein anderes Mutagenese-Verfahren ist die Methode der Trans-  
posonmutagenese bei der die Eigenschaft eines Transposons  
ausgenutzt wird in DNA-Sequenzen zu "springen" und dadurch  
die Funktion des betreffenden Gens zu stören bzw. auszu-  
schalten. Transposons coryneformer Bakterien sind in der  
30 Fachwelt bekannt. So wurden aus *Corynebacterium xerosis*  
Stamm M82B das Erythromycinresistenz-Transposon Tn5432



(Tauch et al., Plasmid (1995) 33: 168-179) und das Chloramphenicolresistenz-Transposon Tn5546 isoliert. Tauch et al. (Plasmid (1995) 34: 119-131 und Plasmid (1998) 40: 126-139) zeigten, daß eine Mutagenese mit diesen Transposonen möglich ist.

Ein anderes Transposon ist das Transposon Tn5531 das bei Ankri et al. (Journal of Bacteriology (1996) 178: 4412-4419) beschrieben wird und beispielhaft im Laufe der vorliegenden Erfindung eingesetzt wurde. Das Transposon Tn5531 enthält das aph3 Kanamycinresistenzgen und kann in Form des Plasmidvektors pCGL0040 verabreicht werden, der in Figur 1 dargestellt ist. Die Nukleotidsequenz des Transposons Tn5531 ist unter der Zugangsnummer (accession number) U53587 bei dem National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) frei verfügbar.

Nach erfolgter Mutagenese vorzugsweise Transposon-Mutagenese wird eine im brnF- oder brnE-Gen defekte Mutante gesucht. Eine im brnF- oder brnE-Gen defekte Mutante wird daran erkannt, daß sie auf Minimalagar gutes Wachstum aber auf Minimalagar, der mit verzweigtkettigen Aminosäurehaltigen Oligopeptiden wie z. B. dem Dipeptid Isoleucylisoleucin supplementiert wurde, schlechtes Wachstum zeigt.

Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der Stamm ATCC14752brnE::Tn5531.

Ein auf die beschriebene Weise hergestellter Stamm kann dann für die Klonierung und Sequenzierung des brnF- und/oder brnE-Gens verwendet werden.

Hierzu kann eine Genbank des interessierenden Bakteriums angelegt werden. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben.

Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E.coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Für die vorliegende Erfindung eignen sich solche Vektoren, die in coryneformen Bakterien vorzugsweise Corynebacterium glutamicum replizieren. Derartige Vektoren sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiel sei der Plasmidvektor pZ1 genannt, der bei Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) beschrieben ist. Die auf die beschriebene Weise erhaltene Genbank wird anschließend mittels Transformation oder Elektroporation in den im brnF- oder brnE-Gen defekten Indikatorstamm überführt und solche Transformanten gesucht, die die Fähigkeit besitzen in Gegenwart verzweigtkettiger Aminosäure-haltiger Oligopeptide auf Minimalagar zu wachsen. Das klonierte DNA-Fragment kann anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

Bei Verwendung einer durch Tn5531-Mutagenese erzeugten Mutante eines coryneformen Bakteriums wie z. B. dem Stamm ATCC14752brnE::Tn5531 kann das brnE::Tn5531-Allel direkt unter Ausnutzung des in ihm enthaltenen Kanamycinresistenzgens aph3 kloniert und isoliert werden. Hierzu verwendet

man bekannte Kloniervektoren wie z. B. pUC18 (Norrande et al., Gene (1983) 26: 101-106 und Yanisch-Perron et al., Gene (1985) 33: 103-119). Als Klonierwirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die Selektion auf Transformanten erfolgt in Gegenwart von Kanamycin. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanten wird anschließend sequenziert. Hierzu kann die von Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467) beschriebene Dideoxy-Kettenabbruchmethode verwendet werden. Hiernach erhält man die stromaufwärts und stromabwärts des Tn5531-Insertionsortes enthaltenen Gene. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen werden dann mit kommerziell erhältlichen Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem Programmpaket Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) oder dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Heidelberg, Deutschland) analysiert und zusammengefügt.

Auf diese Weise wurden die neuen für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodierenden DNA-Sequenzen von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID NO 1, Bestandteil der vorliegenden Erfindung sind. In SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 sind die Kodierregionen des brnF- und brnE-Gens dargestellt. In SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 5 sind die Aminosäuresequenzen der sich aus SEQ ID NO 1, bzw. SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 ergebenden Genprodukte dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind

ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1, oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie

5 z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am

10 N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth

15 et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Er-

20 findung.

Unter Ausnutzung der in SEQ-ID-No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz können geeignete Primer synthetisiert und diese dann dazu verwendet werden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) brnF-, und brnE-Gene verschiedener co-

25 ryneformer Bakterien und Stämme zu amplifizieren. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg,

30 Deutschland, 1994). Alternativ kann die in SEQ-ID-No. 1 dargestellte Nukleotidsequenz oder Teile davon als Sonde zur Suche von brnF- und/oder brnE-Genen in Genbanken von

insbesondere coryneformen Bakterien verwendet werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Firma Roche Diagnostics

- 5 (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die auf diese Weise amplifzierten brnE-, und brnF-Gene enthaltenden DNA-Fragmente werden anschließend kloniert und sequenziert.

- 10 Auf diese Weise wurde die in SEQ-ID-No. 6 dargestellte DNA-Sequenz der Gene brnF und brnE des Stammes ATCC13032 erhalten, die ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist.

- Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach  
15 Überexpression des brnF- und/oder brnE Export-Gens in verbesserter Weise verzweigtkettige Aminosäuren produzieren.

- Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen Herstellung verzweigtkettiger Aminosäuren zu steigern. Durch Maßnahmen zur  
25 Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in  
30 Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ

kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei  
5 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guer-  
rero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga  
(Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al.  
(Gene 102, 93-98 (1991)), in der EP-B 0 472 869, im US Pa-  
tent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9,  
10 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environ-  
mental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al.  
(Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Pa-  
tentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134,  
15 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-  
A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bio-  
engineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiolo-  
gical Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbü-  
chern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurden die erfindungsgemäßen Gene brnF und  
20 brnE mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide  
eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repli-  
ziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B.  
pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology  
(1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-  
25 98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74  
(1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1  
oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf  
pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al.,  
FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1  
30 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwen-  
det werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von verzweigtkettigen Aminosäuren vorteilhaft sein, neben den neuen brnF- und brnE-Genen ein oder mehrere für weitere Enzyme des bekannten Biosyntheseweges der verzweigtkettigen Aminosäuren oder  
5 Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme des Zitronensäure-Zyklus kodierende Gene zu überexprimieren.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Isoleucin

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom<sup>dr</sup>-Allel (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)) oder  
10
- gleichzeitig das für die Threonin-Dehydratase kodierende ilvA-Gen (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin- Dehydratase kodierende ilvA(Fbr)-Allel (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842), oder  
15
- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene ilvBN (Keilhauer et al., (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), oder  
20
- gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende ilvD-Gen (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979), oder
- gleichzeitig das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-19 831 609), oder  
25
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))

überexprimiert werden.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Leucin,

- gleichzeitig das für die Isopropylmalatsynthase kodierende leuA-Gen (Pátek et al., Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140) oder ein für eine "feed back resistente" Isopropylmalatsynthase kodierendes Allel, oder
- gleichzeitig die für die Isopropylmalatdehydratase kodierenden leuC- und leuD-Gene (Pátek et al., Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140), oder
- gleichzeitig das für die Isopropylmalatdehydrogenase kodierenden leuB-Gen (Pátek et al., Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140), oder
- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene ilvBN (Keilhauer et al., (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), oder
- gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende ilvD-Gen (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979), oder
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mgo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))

überexprimiert werden.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Valin



- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene *ilvBN* (Keilhauer et al., (1993) *Journal of Bacteriology* 175: 5595-5603), oder
  - gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende *ilvD*-Gen (Sahm und Eggeling (1999) *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1973-1979), oder
  - gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende *mgo*-Gen (Molenaar et al., *European Journal of Biochemistry* 254, 395 - 403 (1998))
- überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von verzweigtkettigen Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *brnE*- und/oder *brnF*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion verzweigtkettiger Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) erhalten.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle  
5 der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden  
10 den Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an verzweigtkettigen Aminosäuren  
15 gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse der verzweigtkettigen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al.  
20 (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurden bei der Deutschen Sammlung  
25 für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm GM2929pCGL0040  
als DSM 12839

## Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie  
5 alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische  
Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation von  
10 *Escherichia coli* wurde, wenn nicht anders beschrieben, nach  
Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1989) 86: 2172-2175) durchgeführt.

### Beispiel 1

Klonierung und Sequenzierung des *brnF*- und *brnE*-Gens von  
15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

#### 1. Transposonmutagenese

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 wurde einer  
Mutagenese mit dem Transposon Tn5531 unterworfen, dessen  
Sequenz unter der Accession-Nummer U53587 in der Nukleotid-  
20 Datenbank des National Center for Biotechnology Information  
(Bethesda, USA) hinterlegt ist. Aus dem Methylase-defekten  
*E. coli*-Stamm GM2929pCGL0040 (*E. coli* GM2929: Palmer et  
al., Gene (1994) 143: 1-12) wurde das Plasmid pCGL0040 iso-  
liert, welches das zusammengesetzte Transposon Tn5531 ent-  
25 hält (Ankri et al., Journal of Bacteriology (1996) 178:  
4412-4419). Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752  
wurde mittels Elektroporation (Haynes et al., FEMS Micro-  
biology Letters (1989) 61: 329-334) mit dem Plasmid  
pCGL0040 transformiert. Klone, bei denen das Transposon

Tn5531 ins Genom integriert war, wurden anhand ihrer Kanamycinresistenz auf 15 µg/mL Kanamycin enthaltenden LBHIS-Agarplatten identifiziert (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Auf diese Weise wurden 2000

5 Klone erhalten, welche auf verzögertes Wachstum in Anwesenheit von Isoleucyl-isoleucin überprüft wurden. Dazu wurden alle Klone einzeln auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten mit und ohne 3 mM Isoleucyl-isoleucin übertragen. Das Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al. beschriebenen

10 Medium CGXII (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603), enthielt aber zusätzlich 25 µg/mL Kanamycin und 15 g/L Agar. Die Zusammensetzung des von Keilhauer et al. beschriebenen Mediums ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

15 Zusammensetzung des Mediums CGXII

Komponente	Konzentration
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
CaCl <sub>2</sub>	10 mg/L
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/L
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1 mg/L
CuSO <sub>4</sub>	0,2 mg/L
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02 mg/L
Biotin	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	30 mg/L

Die Agarplatten wurden bei 30°C inkubiert und das Wachstum nach 12, 18 und 24 Stunden untersucht. Es wurde eine Transposonmutante erhalten, die ohne Isoleucyl-isoleucin vergleichbar mit dem Ausgangsstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 wuchs, in Anwesenheit von 3 mM Isoleucyl-isoleucin aber verzögertes Wachstum zeigte. Diese wurde als ATCC14752brnF::Tn5531 bezeichnet.

## 2. Klonierung und Sequenzierung des Insertionsortes von Tn5531 in ATCC14752brnF::Tn5531

Um den stromabwärts des Transposons Tn5531 gelegenen Insertionsort in der in Beispiel 1.1 beschriebenen Mutante zu klonieren, wurde zunächst die chromosomale DNA dieses Mutantenstammes wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben isoliert und 400 ng davon mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten. Der vollständige Restriktionsansatz wurde in den ebenfalls mit EcoRI linearisierten Vektor pUC18 (Norander et al., Gene (1983) 26: 101-106) der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup> (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1990) 87: 4645-4649) mittels Elektroporation transformiert (Dower et al., Nucleic Acid Research (1988) 16: 6127-6145). Transformanten, bei denen auf dem Vektor pUC18 die Insertionsorte des Transposons Tn5531 kloniert vorlagen, wurden anhand ihrer Carbenicillin- und Kanamycinresistenz auf 50 µg/mL Carbenicillin und 25 µg/mL Kanamycin enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert. Aus drei der Transformanten wurden die Plasmide präpariert und durch Restriktionsanalyse die Größen der klonierten Inserts bestimmt. Die Nukleotidsequenz des Insertionsortes auf einem der Plasmide mit einem ca. 7,2 kb großen Insert wurde nach

der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden 1,3 kb des Inserts ausgehend von folgendem Oligonukleotid-Primer sequenziert: 5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3'.

Zur Identifizierung des stromaufwärts des Transposons gelegenen Insertionsortes wurde die chromosomale DNA der Mutante mit der Restriktionsendonuklease PstI geschnitten und in den mit PstI linearisierten Vektor pUC18 ligiert. Die weitere Klonierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Nukleotidsequenz des Insertionsortes auf einem der Plasmide mit einem ca. 4,8 kb großen Insert wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden 1,6 kb des Inserts ausgehend von folgendem Oligonukleotid-Primer sequenziert: 5'-CGG TGC CTT ATC CAT TCA GG-3'.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurde mit dem Programmpaket Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) analysiert und zusammengefügt. Diese Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern von 753 bp, und 324 bp Länge, die als SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 dargestellt sind. Die entsprechenden Gene wurden als brnF- und brnE-Gen bezeichnet. Die dazugehörigen Genprodukte umfassen 251 und 108 Aminosäuren und sind als SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 5 wiedergegeben.

## Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung der brnF-, und brnE-Gene aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Die Gene brnE und brnF des Stammes ATCC13032 wurden in den  
5 E. coli Klonierungsvektor pUC18 (Norrande et al., Gene  
(1983) 26: 101-106, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutsch-  
land) kloniert. Die Klonierung wurde in zwei Schritten  
durchgeführt. Zunächst wurden durch eine Polymeraseketten-  
reaktion (PCR) die Gene aus *Corynebacterium glutamicum*  
10 ATCC13032 mittels folgender aus SEQ ID NO 1 abgeleiteter  
Oligonukleotid-Primer amplifiziert.

brnE, brnF, -forward:

5'-[AGC GCT GTC TGC TTA AGC CTT TTC]-3'

brnE, brnF, -reverse:

15 5'-[GCG CGA TCA ATG GAA TCT AGC TTC]-3'

Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 µM  
Deoxynukleotid-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 1  
µM des entsprechenden Oligonukleotids, 100 ng chromosomaler  
DNA von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 Volumen  
20 10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten einer hitzestabi-  
len Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung (Expand High Fidelity  
PCR System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutsch-  
land) in einem Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc.,  
Watertown, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:  
25 94°C für 30 Sekunden, 58°C für 30 Sekunden und 72°C für 2  
Minuten.

Das amplifizierte etwa 1,3 kb große Fragment wurde dann im  
folgenden mit Hilfe des SureClone Ligation Kit (Amersham  
Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Her-



stellers in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18 li-  
giert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde der E. coli  
Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup> (Grant et al., Proceedings of the National  
Academy of Sciences of the United States of America (1990)  
5 87: 4645-4649) transformiert. Transformanten wurden anhand  
ihrer Carbenicillinresistenz auf 50  $\mu$ g/mL Carbenicillin  
enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert. Aus 8 der Trans-  
formanten wurden die Plasmide präpariert und durch Restrik-  
tionsanalyse auf das Vorhandensein des 1,3 kb PCR-Fragments  
10 als Insert überprüft. Das so entstandene rekombinante Plas-  
mid wird im folgenden mit pUC18brnEF bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz des 1,3 kb PCR-Fragments in Plasmid  
pUC18brnEF wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von  
Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National  
15 Academy of Sciences of the United States of America (1977)  
74: 5463-5467). Hierzu wurde das vollständige Insert von  
pUC18brnEF mit Hilfe folgender Primer der Firma Roche Dia-  
gnostics (Mannheim, Deutschland) sequenziert.

Universalprimer:

20 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Reverseprimer:

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 6 wieder-  
gegeben. Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Pro-  
grammpaket Lasergene (Biocomputing Software for Windows,  
25 DNASTAR, Madison, USA) analysiert.

Abbildungen:

- Figur 1: Karte des das Transposon Tn5531 enthaltenden Plasmids pCGL0040. Das Transposon ist als nicht schraffierter Pfeil gekennzeichnet.
- 5 Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:
- EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
  - XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*
  - 10 • ClaI: Restriktionsendonuklease aus *Caryophanum latum*
  - SalI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces albus*
  - ScaI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces caespitosus*
  - SmaI: Restriktionsendonuklease aus *Serratia marcescens*
  - 15 • Amp: Ampicillinresistenzgen
  - Kan: Kanamycinresistenzgen
  - oriBR322: Replikationsregion des Plasmides pBR322

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG  
 Forschungszentrum-Jülich GmbH  
 5 <120> Für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren  
 kodierende Nukleotidsequenzen, Verfahren  
 zu deren Isolierung und ihre Verwendung  
 10 <130> 990128 BT  
 <140>  
 <141>  
 15 <160> 6  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 20 <211> 1271  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752  
 <220>  
 25 <221> gene  
 <222> (101) .. (853)  
 <223> brnF  
 <220>  
 30 <221> gene  
 <222> (853) .. (1176)  
 <223> brnE  
 <400> 1  
 35 gcgcgatcaa tggaatctag cttcatatat tgcacaatag cctagttgag gtgcgcaaac 60  
 tggcaacaaa actaccggc aattgtgtga tgattgtagt gtgcaaaaaa cgcaagagat 120  
 tcattcaagc ctggagggtg cgccatccaa ggcagccctg gaaccagatg ataaaggtta 180  
 tcggcgctac gaaatcgcg c aaggtctaaa aacctccctt gctgcagggt tgggcatgta 240  
 cccgattggg attgcgtttg gtctcttggg tattcaatac ggctacgaat ggtgggcagc 300  
 40 cccactgttt tccggcctga ttttcgcggg ctccaccgaa atgctggtca tcgcccctcg 360  
 tgtgggcgca gcgcccctgg gcgccatcgc gctcaccaca ttgctggtga acttccgcca 420  
 cgtattctat gcgttttcat tcccgtgca tgtggtcaaa aacccattg cccgtttcta 480  
 ttcggttttc gcgcttatcg acgaagccta cgcagtcact gcggccaggc ccgcaggctg 540  
 gtcggcggtg cgacttatct caatgcaa atgcgtttcac tcctactggg tattcggcgg 600  
 45 tctcaccgga gtggcgatcg cagagttgat tccttttgaa attaagggcc tcgagttcgc 660  
 cctttgctct ctctttgtca cgtgacttt ggattcctgc cgaacgaaaa agcagatccc 720  
 ttctctgctg ctgcaggtt tgagcttcac cattgctctt gtggtaatc caggtcaggc 780  
 cctatttgcg gcgctgctga tcttcttggg tctgttgacc atccggtact tcttcttggg 840  
 aaaggctgct aaatgacaac tgatttctcc tgtattctcc ttgttgctgc agtatgtgca 900  
 50 gtcattactt ttgcgctccg ggcggttccg ttcttaatcc ttaagcccct acgtgaatca 960  
 caatttgtgg gcaaaatggc gatgtggatg ccagcaggaa tccttgccat tttgaccgca 1020  
 tcaacgtttc gcagcaatgc gatagatctg aagactctaa cctttggtct cattgccgtt 1080  
 gcgattacag tgggtggcgca tcttcttggc ggtcgacgca ccttggttag cgttggcgct 1140  
 ggcaccatcg tttttgttgg actggtgaat cttttctaaa actgcataaa taacaaaaat 1200  
 55 ccgcatgcc tcaatttgaa ggggatgcgg attttttaag gaacctagaa aaggcttaag 1260  
 cagacagcgc t 1271  
 <210> 2

<211> 753  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(753)  
 <223> brnF

10 <400> 2  
 gtg caa aaa acg caa gag att cat tca agc ctg gag gtg tcg cca tcc 48  
 Val Gln Lys Thr Gln Glu Ile His Ser Ser Leu Glu Val Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

15 aag gca gcc ctg gaa cca gat gat aaa ggt tat cgg cgc tac gaa atc 96  
 Lys Ala Ala Leu Glu Pro Asp Asp Lys Gly Tyr Arg Arg Tyr Glu Ile  
 20 25 30

20 gcg caa ggt cta aaa acc tcc ctt gct gca ggt ttg ggc atg tac ccg 144  
 Ala Gln Gly Leu Lys Thr Ser Leu Ala Ala Gly Leu Gly Met Tyr Pro  
 35 40 45

25 att ggt att gcg ttt ggt ctc ttg gtt att caa tac ggc tac gaa tgg 192  
 Ile Gly Ile Ala Phe Gly Leu Leu Val Ile Gln Tyr Gly Tyr Glu Trp  
 50 55 60

30 tgg gca gcc cca ctg ttt tcc ggc ctg att ttc gcg ggc tcc acc gaa 240  
 Trp Ala Ala Pro Leu Phe Ser Gly Leu Ile Phe Ala Gly Ser Thr Glu  
 65 70 75 80

35 atg ctg gtc atc gcc ctc gtt gtg ggc gca gcg ccc ctg ggc gcc atc 288  
 Met Leu Val Ile Ala Leu Val Val Gly Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ile  
 85 90 95

40 tca ttc ccg ctg cat gtg gtc aaa aac ccc att gcc cgt ttc tat tcg 384  
 Ser Phe Pro Leu His Val Val Lys Asn Pro Ile Ala Arg Phe Tyr Ser  
 115 120 125

45 gtt ttc gcg ctt atc gac gaa gcc tac gca gtc act gcg gcc agg ccc 432  
 Val Phe Ala Leu Ile Asp Glu Ala Tyr Ala Val Thr Ala Ala Arg Pro  
 130 135 140

50 gca ggc tgg tcg gcg tgg cga ctt atc tca atg caa ata gcg ttt cac 480  
 Ala Gly Trp Ser Ala Trp Arg Leu Ile Ser Met Gln Ile Ala Phe His  
 145 150 155 160

55 tcc tac tgg gta ttc ggc ggt ctc acc gga gtg gcg atc gca gag ttg 528  
 Ser Tyr Trp Val Phe Gly Gly Leu Thr Gly Val Ala Ile Ala Glu Leu  
 165 170 175

att cct ttt gaa att aag ggc ctc gag ttc gcc ctt tgc tct ctc ttt 576  
 Ile Pro Phe Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Ala Leu Cys Ser Leu Phe  
 180 185 190

gtc acg ctg act ttg gat tcc tgc cga acg aaa aag cag atc cct tct 624  
 Val Thr Leu Thr Leu Asp Ser Cys Arg Thr Lys Lys Gln Ile Pro Ser  
 195 200 205

5

ctg ctg ctg gca ggt ttg agc ttc acc att gct ctg gtg gta att cca 672  
 Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ser Phe Thr Ile Ala Leu Val Val Ile Pro  
 210 215 220

10

ggt cag gcc cta ttt gcg gcg ctg ctg atc ttc ttg ggt ctg ttg acc 720  
 Gly Gln Ala Leu Phe Ala Ala Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Thr  
 225 230 235 240

15

atc cgg tac ttc ttc ttg gga aag gct gct aaa 753  
 Ile Arg Tyr Phe Phe Leu Gly Lys Ala Ala Lys  
 245 250

20

<210> 3  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752

25

<400> 3  
 Val Gln Lys Thr Gln Glu Ile His Ser Ser Leu Glu Val Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

30

Lys Ala Ala Leu Glu Pro Asp Asp Lys Gly Tyr Arg Arg Tyr Glu Ile  
 20 25 30

35

Ala Gln Gly Leu Lys Thr Ser Leu Ala Ala Gly Leu Gly Met Tyr Pro  
 35 40 45

40

Ile Gly Ile Ala Phe Gly Leu Leu Val Ile Gln Tyr Gly Tyr Glu Trp  
 50 55 60

45

Trp Ala Ala Pro Leu Phe Ser Gly Leu Ile Phe Ala Gly Ser Thr Glu  
 65 70 75 80

50

Met Leu Val Ile Ala Leu Val Val Gly Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ile  
 85 90 95

55

Ala Leu Thr Thr Leu Leu Val Asn Phe Arg His Val Phe Tyr Ala Phe  
 100 105 110

60

Ser Phe Pro Leu His Val Val Lys Asn Pro Ile Ala Arg Phe Tyr Ser  
 115 120 125

65

Val Phe Ala Leu Ile Asp Glu Ala Tyr Ala Val Thr Ala Ala Arg Pro  
 130 135 140

70

Ala Gly Trp Ser Ala Trp Arg Leu Ile Ser Met Gln Ile Ala Phe His  
 145 150 155 160

75

Ser Tyr Trp Val Phe Gly Gly Leu Thr Gly Val Ala Ile Ala Glu Leu  
 165 170 175

80

Ile Pro Phe Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Ala Leu Cys Ser Leu Phe  
 180 185 190

Val Thr Leu Thr Leu Asp Ser Cys Arg Thr Lys Lys Gln Ile Pro Ser  
 195 200 205  
 5 Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ser Phe Thr Ile Ala Leu Val Val Ile Pro  
 210 215 220  
 Gly Gln Ala Leu Phe Ala Ala Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Thr  
 225 230 235 240  
 10 Ile Arg Tyr Phe Phe Leu Gly Lys Ala Ala Lys  
 245 250  
 15  
 <210> 4  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752  
 20  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(324)  
 <223> brnE  
 25  
 <400> 4  
 atg aca act gat ttc tcc tgt att ctc ctt gtt gtc gca gta tgt gca 48  
 Met Thr Thr Asp Phe Ser Cys Ile Leu Leu Val Val Ala Val Cys Ala  
 1 5 10 15  
 30 gtc att act ttt gcg ctc cgg gcg gtt ccg ttc tta atc ctt aag ccc 96  
 Val Ile Thr Phe Ala Leu Arg Ala Val Pro Phe Leu Ile Leu Lys Pro  
 20 25 30  
 35 cta cgt gaa tca caa ttt gtg ggc aaa atg gcg atg tgg atg cca gca 144  
 Leu Arg Glu Ser Gln Phe Val Gly Lys Met Ala Met Trp Met Pro Ala  
 35 40 45  
 40 gga atc ctt gcc att ttg acc gca tca acg ttt cgc agc aat gcg ata 192  
 Gly Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ala Ser Thr Phe Arg Ser Asn Ala Ile  
 50 55 60  
 gat ctg aag act cta acc ttt ggt ctc att gcc gtt gcg att aca gtg 240  
 Asp Leu Lys Thr Leu Thr Phe Gly Leu Ile Ala Val Ala Ile Thr Val  
 45 65 70 75 80  
 gtg gcg cat ctt ctt ggc ggt cga cgc acc ttg ttg agc gtt ggc gct 288  
 Val Ala His Leu Leu Gly Gly Arg Arg Thr Leu Leu Ser Val Gly Ala  
 85 90 95  
 50 ggc acc atc gtt ttt gtt gga ctg gtg aat ctt ttc 324  
 Gly Thr Ile Val Phe Val Gly Leu Val Asn Leu Phe  
 100 105  
 55  
 <210> 5  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752

<400> 5  
 Met Thr Thr Asp Phe Ser Cys Ile Leu Leu Val Val Ala Val Cys Ala  
 1 5 10 15  
 5 Val Ile Thr Phe Ala Leu Arg Ala Val Pro Phe Leu Ile Leu Lys Pro  
 20 25 30  
 10 Leu Arg Glu Ser Gln Phe Val Gly Lys Met Ala Met Trp Met Pro Ala  
 35 40 45  
 Gly Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ala Ser Thr Phe Arg Ser Asn Ala Ile  
 50 55 60  
 15 Asp Leu Lys Thr Leu Thr Phe Gly Leu Ile Ala Val Ala Ile Thr Val  
 65 70 75 80  
 Val Ala His Leu Leu Gly Gly Arg Arg Thr Leu Leu Ser Val Gly Ala  
 85 90 95  
 20 Gly Thr Ile Val Phe Val Gly Leu Val Asn Leu Phe  
 100 105  
 25  
 <210> 6  
 <211> 1271  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032  
 30  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (101)..(853)  
 <223> brnF  
 35  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (853)..(1176)  
 <223> brnE  
 40  
 <400> 6  
 ggcgcgatcaa tgggaatctag cttcatatat tgcacaatag cctagttgag gtgcgcaaac 60  
 tggcaacaaa actaccggc aattgtgtga tgattgtagt gtgcaaaaaa cgcaagagat 120  
 tcattcaagc ctggagggtg cgccatccaa ggcagccctg gaaccagatg ataaaggtta 180  
 45 tcggcgctac gaaatcgcg aaggtctaaa aacctccctt gctgcagggt tgggcatgta 240  
 cccgattggt attgcgtttg gtctcttggg tattcaatac ggctacgaat ggtgggcagc 300  
 cccactgttt tccggcctga ttttcgcggg ctccaccgaa atgctgggtca tcgccctcgt 360  
 tgtgggcgca gcgccctgg gcgccatcg gctcaccaca ttgctgggtga acttccgcca 420  
 cgtattctat gcgttttcat tcccgctgca tgtgggtcaaa aacccattg cccgtttcta 480  
 50 ttcggttttc gcgcttatcg acgaagccta cgcagtcact gcggccaggc ccgcaggctg 540  
 gtcggcggtg cgacttatct caatgcaaat agcgtttcac tcctactggg tattcggcgg 600  
 tctcaccgga gtggcgatcg cagagttgat tccttttgaa attaagggcc tcgagttcgc 660  
 cctttgctct ctctttgtca cgctgacttt ggattcctgc cgaacgaaaa agcagatccc 720  
 ttctctgctg ctgcaggtt tgagcttcac cattgctctt gtggtaattc cagggtcaggc 780  
 55 cctatttgcg gcgctgctga tcttcttggg tctgttgacc atccggtact tcttcttggg 840  
 aaaggctgct aaatgacaac tgatttctcc tgtattctcc ttgttgcgc agtatgtgca 900  
 gtcattactt ttgcgctccg ggcggttccg ttcttaatcc ttaagcccct acgtgaatca 960  
 caatttgtgg gcaaaatggc gatgtggatg ccagcaggaa tccttgccat ttgaccgca 1020  
 tcaacgtttc gcagcaatgc gatagatctg aagactctaa cctttggtct cattgccgtt 1080

gcgattacag tggaggcgca tcttcttggc ggtcgacgca ccttggtgag cgttggcgct 1140  
ggcaccatcg tttttgttgg actggtgaat cttttctaaa actgcataaa taacaaaaat 1200  
ccgcatgcc tcaatttgaa ggggatgcgg attttttaag gaacctagaa aaggcttaag 1260  
cagacagcgc t 1271



## Patentansprüche

1. Isolierte Polynukleotide, enthaltend mindestens eine der Polynukleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch  
5 ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das mindestens eine Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5 enthält,
  - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens  
10 70 % identisch ist mit mindestens einer Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) oder c), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenzen von a), b), oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
- 20 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) eine der Nukleotidsequenzen, gezeigt in SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 6, oder
  - 25 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 5 5. Aminosäuresequenz des Proteins, abgeleitet aus den Nukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dargestellt in der SEQ-ID-No. 2 und der SEQ-ID-No. 4.
6. Coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der Gattung Corynebacterium, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 2 oder 5.
7. Verfahren zur Herstellung von verzweigtkettigen L-Aminosäuren durch Fermentation coryneformer Bakterien,  
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen man das brnE- und/oder brnF-Gen oder dafür codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7,  
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7,  
25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 10,  
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man einen mit einem oder mehreren Plasmidvektoren transformierten Stamm einsetzt, und der die Plasmidvek-

tor(en) die für das brnE- und/oder brnF-Gen codierende Nukleotidsequenz trägt (tragen).

11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 10,  
5        d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,  
      daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin herstellen.
12. Verfahren zur Herstellung von verzweigtkettigen L-Aminosäuren,  
10        d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,  
      daß man folgende Schritte durchführt:
- a)        Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, in denen  
15        zumindest das brnE- und/oder brnF-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird, ggf. in Kombination mit weiteren Genen,
  - b)        Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium  
20        oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
  - c)        Isolieren der L-Aminosäure.
13. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
25        d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,  
      daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.
14. Verfahren zur Isolierung des brnE- bzw. brnF-Gen,  
30        d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,  
      daß man als Indikatorstämme in diesem/diesen Gen(en) defekte Mutanten, vorzugsweise coryneformer Bakterien gewinnt, die auf einem ein Isoleucin und/oder Leucin und/oder Valin haltiges Oligopeptid enthaltenden Nährmedium nicht oder nur gering wachsen und

- 5
- a) das brnE- bzw. brnF-Gen nach dem Anlegen einer Genbank identifiziert und isoliert, oder
  - b) im Fall der Transposon-Mutagenese auf das bevorzugt eine Antibiotikaresistenz enthaltende Transposon selektiert und so die gewünschten Gene erhält.

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft isolierte Polynukleotide, enthaltend mindestens eine der Polynukleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das mindestens eine Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das  
10 eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit mindestens einer Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) oder c), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c),

wobei die Polypeptide die biologische Aktivität der Enzyme aufweisen, für das das brnE bzw. bernF-Gen codiert, und  
20 Verfahren zur fermentativen Herstellung von verzweigtkettigen L-Aminosäuren unter Verstärkung der genannten Gene.

Figur 1:

